



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑩ DE 44 11 588 C 1

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 P 19/34
C 07 H 21/00
// C07C 229/12

②① Aktenzeichen: P 44 11 588.1-41
②② Anmeldetag: 30. 3. 94
④③ Offenlegungstag: —
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 28. 9. 95

DE 44 11 588 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:
Deutsches Rheuma Forschungszentrum, 14109
Berlin, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte Gulde Hengelhaupt Ziebig, 10785
Berlin

⑦② Erfinder:
Weissensteiner, Thomas, Dipl.-Biochemiker,
London, Long Lane, GB

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
Rees. W.A.et.al., Biochemistry 32, 1993, 137-44;

This document
has been supplied by
NERAC[®]
Phone: 860-872-9331
FAX: 860-875-1749

⑤④ Puffer für DNA- und RNA-Polymerase-Reaktionen

⑤⑦ Die Erfindung betrifft einen Puffer für DNA- und RNA-
Polymerase-Reaktionen, der Betain enthält, und die Verwen-
dung von Betain in DNA- und RNA-Polymerase-Reaktionen,
insbesondere in der spezifischen PCR von Histokompatibili-
täts-Antigenen (HLA) und der reversen Transkription von
RNA in cDNA unter Verwendung eines Oligo-dT-Primers.

DE 44 11 588 C 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Puffer für DNA- und RNA-Polymerase-Reaktionen, der Betain enthält, und die Verwendung von Betain in DNA- und RNA-Polymerase-Reaktionen, insbesondere in der spezifischen Polymerase-Ketten-Reaktion und in der reversen Transkription von RNA in cDNA (RT).

Es ist bekannt, daß die in der Polymerase-Ketten-Reaktion verwendeten Puffer Tris-HCL, Tricin, Kaliumchlorid und Magnesiumchlorid beinhalten. Auch wurde der Zusatz von DMSO (Winship, P. R. et al., 1989, Nucl. Acids Res. 17, 1266) oder nicht-ionischen Detergenzien (Bachmann, B. et al., 1990, Nucl. Acids Res. 18, 1309) vorgeschlagen, um die DNA-Sequenzierungsreaktion zu verbessern und Basenmißpaarungen zu vermeiden.

Hung et. al. beschreiben in Nucl. Acids Res. Vol. 18, No. 16, 4953 (1990) den Zusatz von Tetramethylammoniumchlorid zu den üblichen PCR-Puffern, um die Spezifität der PCR zu erhöhen.

Um DNA-Moleküle mit mehr als 6 kbp zu amplifizieren, wird von M. R. Ponce et. al. in Nucl. Acids Res. Vol. 20, No. 3, 623 (1992) der Zusatz von Beta-Mercaptoethanol, Gelatine und Thesit beschrieben.

Alle genannten PCR-Puffer weisen jedoch den Nachteil auf, daß durch die vorhandene Salzkonzentration die Amplifikation bestimmter DNA-Moleküle negativ beeinflußt werden kann. Daneben sind Dimethylsulfoxid und Tetramethylammoniumchlorid toxisch.

Es wurde nun gefunden, daß Puffer, die N, N, N-Trimethylglycin (Betain) und keine Kalium-, Ammonium- oder Tetraalkylammoniumionen enthalten, sehr gut für spezifische Polymerase-Ketten-Reaktionen geeignet sind.

Die Konzentration von Betain im erfindungsgemäßen Puffer kann 200 bis 1000 mM betragen. So hat sich zum Beispiel bei der spezifischen PCR von HLA-Antigenen gezeigt, daß eine Zusammensetzung des Puffers aus 500 bis 800 mM Betain und 1 bis 6 mM Magnesiumchlorid optimal ist. Insbesondere enthält der Puffer zur spezifischen Amplifikation von HLA-B-Allelen 500 bis 800 mM Betain, 1 bis 6 mM Magnesiumchlorid, 8 bis 12 mM N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin mit pH 8,3 und 93 bis 106 µg/ml BSA V. Dabei wird die PCR eines Fragmentes des HLA-B-Gens enthaltend Sequenzen von Exon 2 bis Exon 3 wie zum Beispiel von B 27, B27-Subtypen, B 12, B 44, B 45, B 7, BW 22, B 13, B 14, B 18, B 73, B 41, B-4001 oder B 42 mit 2 Allel-spezifischen Oligodesoxynukleotid-Primern durchgeführt, die am 3'-Ende in den drei letzten Nukleotiden mit der gesuchten Allelsequenz übereinstimmen und in der übrigen Sequenz zu mindestens 80% mit der Allelsequenz homolog sind.

Überraschend wurde auch gefunden, daß Betain-enthaltende Puffer für die reverse Transkription von RNA in cDNA sehr gut geeignet sind. Ein positiver Einfluß auf die reverse Transkription von sekundärstruktureicher RNA wurde festgestellt.

Insbesondere können die erfindungsgemäßen Puffer für die reverse Transkription von RNA in cDNA unter Verwendung eines Oligo-dT-Primers und von M-MLV reverser Transkriptase bis zu 3 M Betain und ggf. auch Kaliumchlorid enthalten. Die Aktivität der reversen Transkriptase wird, wie auch die Aktivität der Taq-Polymerase, durch Betain nicht merklich beeinträchtigt.

Vorzugsweise enthält ein erfindungsgemäßer Puffer zur reversen Transkription von RNA in cDNA zum Beispiel unter Verwendung von Oligodesoxythymidin ((dT)₁₂₋₁₈) und M-MLV reverser Transkriptase 1 bis 3 M Betain, 60 bis 75 mM Kaliumchlorid und 1 bis 6 mM Magnesiumchlorid.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform kann der Puffer zur reversen Transkription von RNA in cDNA auch 1 bis 3 M Betain, 20 bis 75 mM Kalium- oder Ammoniumionen und 1 bis 10 mM Magnesiumionen enthalten.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß Betain eine Reihe von Vorteilen herkömmlicher, bisher in der PCR- und reversen Transkription verwendeten Kosolventien kombiniert:

Es ist chemisch inert und nicht-ionisch, d. h. es kann mit einer Anzahl anderer Kosolvenzien und Salzen kombiniert werden, um optimale Reaktionsbedingungen für die jeweiligen Primer und Template zu schaffen.

Daneben erleichtert es die Transkription GC-reicher Domänen. Da nur GC-Basenpaare destabilisiert werden, können Primer so gewählt werden, daß ihre Hybridisierung mit der Zielsequenz möglichst wenig beeinträchtigt wird.

Allgemeine Destabilisierung von dsDNA, z. B. durch Glycerin, Dimethylsulfoxid oder Formamid setzt auch die Hybridisierungstemperatur der Primer herab und hat damit sowohl positive wie negative Auswirkungen auf die Ausbeute von DNA-Polymerase-Reaktionen. Betain ist unter den nicht-ionischen Kosolvenzien einzigartig in seiner Eigenschaft, AT-Basenpaare zu binden und dadurch zu stabilisieren. Da nicht-ionische Kosolvenzien allgemein dsDNA destabilisieren, erfolgt in Anwesenheit von Betain insgesamt eine spezifische Destabilisierung GC-reicher Domänen in DNA und RNA. Betain ist jedoch erheblich billiger als Deoxyguanidin-Analoga wie sie zu diesem Zweck in Sequenzierung und PCR erfolgreich eingesetzt wurden und kann außerdem auch in der RT verwendet werden. AT-reiche Primer wie z. B. (dT)₁₂₋₁₈ in der RT werden jedoch weniger beeinflusst als GC-reiche Domänen im Templat.

Magnesiumchlorid ist ein essentieller Kofaktor für DNA-Polymerasen, jedoch hängt die optimale Konzentration in der PCR stark von den jeweiligen Primern oder Templaten ab. In Gegenwart von Betain erweitert sich dieser optimale Bereich, wodurch sich die Optimierung, insbesondere von Koamplifikationen ("Multiplex-PCR"), vereinfacht.

Desweiteren ist bekannt, daß sowohl NaCl als auch Heparin als Verunreinigungen in DNA-Proben auftreten können. So hat Heparin in Konzentrationen zwischen $2,5 \cdot 10^{-4}$ – 10^{-3} U/µl ähnliche Effekte wie NaCl. Im Stand der Technik wurde deshalb Heparinase-Verdau oder Vorbehandlung Heparin-enthaltender DNA mit Chelex 100 vorgeschlagen (Francesca Poli, Rosa Catteano, Loretta Crespiatico, Angelea Nocco und Girolamo Sirchia, PCR Methods and Applications, 1993, 2, 356–358).

Es wurde nun gefunden, daß die PCR-Ausbeuten, insbesondere von HLA-B, bei Heparin-enthaltenden DNA-Proben in Gegenwart von Betain deutlich verbessert werden können. Vorzugsweise zeigen sich diese Befunde bei Betainkonzentrationen von 500–800 mM. In Gegenwart von 0,8 M Betain werden bis zu 10fach

höhere Heparinkonzentrationen toleriert.

Betain macht also die Aufreinigung von Salz- oder Heparin-enthaltenden DNA-Proben weitgehend überflüssig, was vor allem in der routinemäßigen Untersuchung klinischer und forensischer Proben von Vorteil ist.

Daneben ist Betain im Gegensatz zu den Kosolvenzien DMSO, Formamid und Methyl-Quecksilberhydroxid ungiftig und ein natürlicher Schutz, den Zellen im Laufe der Evolution gegen thermische und ionische Denaturierung ihrer Proteine entwickelt haben.

Die Aktivität der Taq-Polymerase und der reversen Transkriptase wird durch Betain nicht merklich beeinträchtigt.

Die Erfindung soll nachstehend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden:

Ausführungsbeispiele

1. Polymerase-Ketten-Reaktion von HLA-B-Allelen

a) Reaktionsansatz

Die Amplifikationen werden in DNA-Thermocyclern (z. B. dem DNA-Thermocycler 480 der Firma Perkin-Elmer-Cetus) in 500 µl Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. DNA wird durch Verdauung von zu untersuchenden Proben mit Proteinase K und nachfolgende Phenol/Chloroform-Extraktion gewonnen. Zur Reaktion werden Mengen von 50 bis 1000 ng in einem 20 µl Reaktionsvolumen eingesetzt.

Der Ansatz enthält außerdem:

10 mM N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin, pH 8,3 bei 20°C (Tricin)

100 µg/ml Rinder-Serumalbumin (BSA V)

0,2 mM je Nukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

3 ng/µl je Primer

0,025 U/µl Taq-Polymerase

mit TNFβ als Kontrolle:

600 mM N,N,N-Trimethylglycin (Betain)

3 mM Magnesiumchlorid

mit Genen XA/XB als Kontrolle:

800 mM N,N,N-Trimethylglycin (Betain)

4 mM Magnesiumchlorid

b) Temperaturschritte

Die PCR-Programme werden in folgenden Temperaturschritten durchgeführt:

4' 94 °C Vordenaturierung			
B27-PCR		allgemein (einschl. B27)	
40 Cyclen a'	1' 94 °C	5 Cyclen a'	1' 94 °C
	1' 60 °C		1' 68 °C
	1' 72 °C		1' 72 °C
		5 Cyclen a'	1' 94 °C
			1' 64 °C
			1' 72 °C
		30 Cyclen a'	1' 94 °C
			1' 60 °C
			1' 72 °C
		9' 72 °C Primer-Verlängerung	

Erfindungsgemäß erweisen sich in Gegenwart von Betain Hybridisierungstemperaturen, die ca. 10°C niedriger liegen als die theoretische Denaturierungstemperatur der Primer, und MgCl_2 -Konzentrationen zwischen 3 und 4 mM als vorteilhaft.

c) Detektion

Erfolgreiche Amplifikation der internen Kontrolle und gegebenenfalls eines allelspezifischen HLA-B-Fragments wird durch Elektrophorese in einem 1,5%-igen Agarosegel, 0,5x TBE-Puffer geprüft. DNA-Banden werden durch Anfärbung mit Ethidiumbromid und Fluoreszenz unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht. Die Länge der erhaltenen PCR-Produkte ist eine Kontrolle für die Spezifität der PCR für HLA-B.

d) Ergebnisse

HLA-B27, B7, B8, B41, B42, B60, B61 und B73 wurden unter obigen Bedingungen erfolgreich amplifiziert. Die Spezifität der HLA-B-PCR wurde mit Hilfe der folgenden Standard-Zelllinien getestet: Positive Kontrollen waren

- a) für B27 und seine Subtypen: HOM2, JESTHOM, WT24, LS40 sowie die nicht-standartisierten Linien LH, NW, R69 und Wewak,
- b) für B60 (B*40012): SLE, MADURA, MT14B, PE117, BRU, RLO, LS40 (B27/B60)
- c) für B7: HHKB, SAVC, LD2B, R69 (B7/B27)
- d) für B8: VAVY, LH (B8/B27)
- e) für B42: RSH
- f) für B41: RLO (B38/B41)
- g) für B61 (B*4002) : SWEIG

Als Negativkontrolle dienten außerdem zahlreiche weitere, für die häufigsten HLA-B-Allele repräsentative, Standardlinien oder Linien, deren Allelsequenz zu einem der beiden verwendeten Primern vollständig komplementär war (z. B. B14 und B16 mit B7CREG1 in der B27-PCR).

Von 50 sowohl serologisch als auch mit Hilfe der PCR auf HLA-B27 untersuchten Spendern wurde in 43 Fällen positive Übereinstimmung zwischen beiden Tests und in 6 Fällen negative Übereinstimmung gefunden. Eine Probe eines Patienten mit Bechterew war serologisch B27-negativ und positiv anhand des PCR-Ergebnisses. Einmal wurde kein PCR-Produkt von einem serologisch positiven gesunden Spender erhalten. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde weiterhin durch Gelelektrophorese (Groesse) und in den Amplifikationsprodukten von 22 verschiedenen vollständig HLA-B typisierten B27-heterozygoten Proben durch Verdau mit Restriktionsenzymen bestätigt.

Unspezifische (Co-)Amplifikationen wurden unter den obigen Bedingungen nicht beobachtet.

Um den Einfluß von Tetramethylammoniumchlorid, Betain und NaCl auf die Amplifikation von B7, B8 und B27 zu untersuchen wurden vier Puffer enthaltend 50 mM KCl und 1,5 mM MgCl_2 getestet: zwei handelsübliche (Boehringer Mannheim, Promega) mit Tris sowie zwei eigene mit Tris oder Tricine.

Es zeigte sich, daß 50 mM KCl sowie geringe Verunreinigungen mit 5–10 mM NaCl (final) die PCR der HLA-B-Allele der internen Kontrollen erst bei 70 mM NaCl-Konzentrationen behindern. Verbesserte Amplifikation wird jedoch in Gegenwart von 50 mM TMACl erzielt und optimale PCR von HLA-B7, B8 und B27 bei 0,6–1,0 M Betain- und 2,5–4 mM MgCl_2 -Konzentrationen. Oberhalb dieser Grenzen wirkt Betain inhibierend auf eine PCR mit den oben genannten Primern. Während die Amplifikation der internen Kontrollen in Abwesenheit isostabilisierender Substanzen robuster als die HLA-B-PCR ist, kehrt sich dieses Verhältnis in Gegenwart von Betain und TMACl um.

2. Reverse Transkription mit M-MLV reverser Transkriptase

a) Reaktionsansatz

- 3,0 M N,N,N-Trimethylglycin (Betain)
- 50 mM Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan (Tris) pH 8,3 bei 20°C
- 75 mM KCl
- 3 mM MgCl_2
- 10 mM 1,4 Dithio-Threitol (DTT)
- 400 mM je Nukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 100 mM Oligodesoxythymidin ((dT)_{12–18})
- 10 U/41 Murine Moloney-Leukaemie-Virus reverse Transkriptase (M-MLV) (Hersteller: GIBCO BRL)

RNA von ca. 2×10^5 Blutzellen wird durch Guanidin-Isothiocyanat/Phenolextraktion gewonnen und in destilliertem Wasser gelöst.

Vordenaturierung geschieht in Gegenwart von Oligodesoxythymidin für 10 Minuten bei 65°C. Dann werden die übrigen Reagenzien zugefügt und für 60 Minuten bei 37°C, 43°C oder 51°C inkubiert.

Die erhaltene cDNA wird durch semiquantitative PCR der T-Zellrezeptorgene V-beta8, V-beta20 und C-alpha geschätzt.

Es zeigte sich, daß Betain in Konzentrationen bis zu 3 M keinen sichtbaren Nachteil auf die cDNA-Ausbeute

bei den üblichen Reaktionstemperaturen hat, jedoch den Vorteil, daß die erhöhte Temperatur von 51°C von M—MLV-reverser Transkriptase erheblich besser als in herkömmlichen RT-Puffern ohne Betain toleriert wird.

Patentansprüche

1. Puffer für DNA- und RNA-Polymerase-Reaktionen, enthaltend Betain. 5
2. Puffer nach Anspruch 1 für die spezifische Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), vorzugsweise für die PCR von Histokompatibilitäts-Antigenen (HLA).
3. Puffer nach Anspruch 1 oder 2 für die spezifische PCR von HLA—B-Allelen unter Verwendung von Taq-Polymerase. 10
4. Puffer nach einem der Ansprüche 2 oder 3, enthaltend 200—1000 mM Betain.
5. Puffer nach einem der Ansprüche 2 bis 4, enthaltend 200 bis 1000 mM Betain und 1 bis 6 mM Magnesiumchlorid.
6. Puffer nach einem der Ansprüche 2 bis 5, enthaltend 500 bis 800 mM Betain, 1 bis 6 mM Magnesiumchlorid, 8 bis 12 mM N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin mit pH 8,3 und 93 bis 106 µg/ml BSA V. 15
7. Puffer nach Anspruch 1 für die reverse Transkription von RNA in cDNA, vorzugsweise unter Verwendung eines Oligo-dT-Primers und M—MLV reverser Transkriptase.
8. Puffer nach Anspruch 1 oder 7 für die reverse Transkription von RNA in cDNA unter Verwendung von Oligodesoxythymidin ((dT)_{12–18}).
9. Puffer nach Anspruch 7 oder 8, enthaltend bis zu 3 M Betain. 20
10. Puffer nach einem der Ansprüche 7 bis 9, enthaltend 1 bis 3 M Betain, 20 bis 75 mM Kalium- oder Ammoniumionen und 1 bis 10 mM Magnesiumionen.
11. Puffer nach Anspruch 10, enthaltend 1 bis 3 M Betain, 60 bis 75 mM Kaliumchlorid und 1 bis 6 mM Magnesiumchlorid.
12. Verwendung von Betain für DNA- und RNA-Polymerase-Reaktionen. 25
13. Verwendung gemäß Anspruch 12 für die spezifische PCR, vorzugsweise für die PCR von Histokompatibilitäts-Antigenen (HLA).
14. Verwendung gemäß Anspruch 12 oder 13 zur Amplifikation eines Fragmentes des HLA—B-Gens enthaltend Sequenzen von Exon 2 bis Exon 3.
15. Verwendung gemäß Anspruch 12 für die reverse Transkription von RNA in cDNA, vorzugsweise unter Verwendung eines Oligo-dT-Primers und M—MLV reverser Transkriptase. 30

35

40

45

50

55

60

65